From Suberin to Symbiosis: Decoding Passage Cell Identity in *Lotus japonicus* and its Functional Links to Nodulation.



Doctoral thesis

for

the award of the doctoral degree

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

of the University of Cologne

Submitted by

Swati Mahiwal

2026

This work was carried out at the Max Planck Institute for Plant Breeding Research in Cologne, in the Department of Plant-Microbe Interactions (Director: Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert), within the research group of Prof. Tonni Grube Andersen with doctoral scholarship support from Deutscher Akademischer Austauschdienst.



Reviewers:

Prof. Dr. Ute Höcker (University of Cologne)

Prof. Dr. Thomas Ott (University of Freiburg)

Chair:

Prof. Dr. Michael Bonkowski (University of Cologne)

Minute taker:

Dr. Sebastian Samwald (Max Planck Institute for Plant Breeding Research)

Date of examination: 22nd September 2026.

1. Abstract

Selective acquisition of water and nutrients is mediated by roots. Before reaching the central vasculature, these nutrients must pass through the epidermal, cortex, and the endodermal tissues. The endodermis is the innermost cortical cell layer that contain crucial barriers which act as filters for the uptake processes. In older root parts, most endodermal cells undergo suberization, except some xylem pole associated endodermal cells. Based on the assumption that they provide a low-resistance “passage” into the xylem these endodermal cells are termed passage cells. However, we have limited knowledge of passage cells – especially outside of the model plant Arabidopsis thaliana. Remarkably, similar to passage cells, the formation of Nitrogen-fixing organs termed nodules occurs adjacent to the xylem pole, which raises the question whether these specialized organs are connected to passage cell’s function. To answer this, we set out to investigate the suberin patterning and passage cell formation in Lotus. Our findings revealed that a single cell file within the xylem pole associated endodermis (XPE), that remains unsuberized as compared to other neighboring xylem pole associated endodermal cell files. To investigate further, we employed Laser capture microdissection to hunt for passage cell specific markers. We selected 5 candidate genes, out of which, 3 showed expression in individual xylem pole associated endodermal cells, validated by Hybridization chain reaction- Fluorescence in-situ hybridization. 2 suberin related GDSL esterases/lipases (GELPs), termed as *LjGELP_XP* and *LjGELP_PP* showed specific enrichments in XPE and phloem pole endodermis (PPE) respectively. Promoter specific transient gene expression utilizing hairy roots reveal that most of these promoters except have broad expression domain within the endodermis, which corresponds to suberin patterning. Further, q-PCR data suggests that Abscisic acid and cytokinin differentially affect the expression of these Passage cell candidates and the suberin specific genes pointing towards the underlying regulatory mechanisms controlled by these two hormones in specifying Passage cell identity and function. Combined, our findings define the suberin pattern in Lotus and establishes powerful tools that can be utilized to study the endodermis specific gene expression in Lotus and thereby give insight into passage cells and their function in connection to nodulation.

1. Abstract

Die selektive Aufnahme von Wasser und Nährstoffen erfolgt über die Wurzeln. Bevor diese Nährstoffe das zentrale Gefäßsystem erreichen, müssen sie die Epidermis, den Cortex und die Endodermis durchqueren. Die Endodermis ist die innerste Zellschicht des Cotrex und enthält wichtige Barrieren, die als Filter für die Aufnahmeprozesse fungieren. In älteren Wurzelabschnitten durchlaufen die meisten Endodermiszellen eine Suberisierung, mit Ausnahme einiger Endodermiszellen, die mit dem Xylem-Pol assoziiert sind. Ausgehend von der Annahme, dass sie einen widerstandsarmen „Durchgang“ ins Xylem bilden, werden diese Endodermiszellen als Durchgangszellen bezeichnet. Allerdings ist unser Wissen über Durchgangszellen begrenzt – insbesondere außerhalb der Modellpflanze Arabidopsis thaliana. Bemerkenswerterweise erfolgt, ähnlich wie bei den Durchgangszellen, die Bildung von stickstofffixierenden Organen, den sogenannten Knöllchen, in unmittelbarer Nähe des Xylem-Pols, was die Frage aufwirft, ob diese spezialisierten Organe mit der Funktion der Durchgangszellen in Verbindung stehen. Um diese Frage zu beantworten, haben wir die Suberinverteilung und die Bildung von Durchgangszellen bei Lotus japonicus untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine einzelne Zellreihe innerhalb der xylem-pol-assoziierten Endodermis (XPE) im Gegensatz zu anderen benachbarten xylem-pol-assoziierten Endodermiszellreihen nicht verholzt ist. Zur weiteren Untersuchung setzten wir die Laser-Capture-Mikrodissektion ein, um nach spezifischen Markern für Durchgangszellen zu suchen. Wir wählten ٥ Kandidatengene aus, von denen ٣ in einzelnen xylem-pol-assoziierten Endodermzellen exprimiert wurden, was durch Hybridisierungs-Kettenreaktion (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) validiert wurde. Zwei Suberin-verwandte GDSL-Esterasen/Lipasen (GELPs), bezeichnet als LjGELP_XP und LjGELP_PP, zeigten eine spezifische Anreicherung in der XPE bzw. der phloempolaren Endodermis (PPE). Die promotorspezifische transiente Genexpression unter Verwendung von Haarwurzeln zeigt, dass die meisten dieser Promotoren, mit wenigen Ausnahmen, ein breites Expressionsspektruminnerhalb der Endodermis aufweisen, was dem Suberin-bildungsmuster entspricht.

Darüber hinaus deuten q-PCR-Daten darauf hin, dass Abscisinsäure und Cytokinin die Expression dieser Passage-Zell-Kandidaten und der suberinspezifischen Gene unterschiedlich beeinflussen, was auf die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen hindeutet, die von diesen beiden Hormonen bei der Festlegung der Identität und Funktion der Passage-Zellen gesteuert werden. Insgesamt beschreiben unsere Ergebnisse das Suberinmuster bei Lotus japonicus und schaffen leistungsstarke Werkzeuge, die zur Untersuchung der endodermisspezifischen Genexpression bei Lotus genutzt werden können und somit